

卒業論文要旨
金表面への葉緑体固定化と光反応特性

(材料設計) 竹田津 悠

【緒言】

葉緑体は、光のエネルギーで電荷の分離を行う高効率可視光光触媒である。植物の光合成では、電荷分離・電子輸送の過程は効率的であるが、後続の還元反応(カルビンベンソン回路での反応)は効率的ではない。一方、人工光触媒では、電荷を分離して電子を輸送するプロセスを構築することが非常に困難であるため、いまだ人工光合成は実現していない。そこで、葉緑体に光のエネルギーによる電荷分離を行わせ、発生させた電子を使って酵素による酸化還元反応を誘起することができれば、半人工的な光合成が期待される。植物から取り出した葉緑体と酵素をデバイスとして用いるには、基質溶液との接触面積を大きくするために、葉緑体を薄膜状に固定することが望ましい。しかし、薄膜の吸光度は非常に小さく、直接光照射しても効率よく光励起できない。そこで当研究室では、光を金表面に局在できる表面プラズモン励起を試みている。本研究は、金薄膜上に葉緑体と酸化還元酵素を固定化し、半人工的光合成による有用物質合成を目的とした。

【結果と考察】

溶液中における単離葉緑体チラコイドの光合成機能の検証
光合成機能はHill反応により検証した。葉緑体懸濁液¹ 20 μg/ml に電子受容体として、0.1 mM ジクロロフェノールインドフェノール(DCPIP) 3 ml を添加して、632.8 nm、12.5 mW のレーザーを照射しクロロフィルを励起した。葉緑体から発生する電子を補足して還元消失するDCPIPの吸光度変化を、600 nm の発光ダイオードを光源として測定した (Fig.1) クロロフィル1分子の単位時間あたりの放出電子数を求めた。

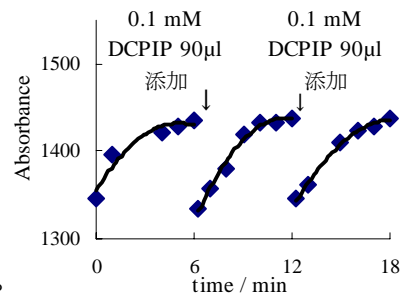


Fig.1 DCPIP とチラコイド懸濁液の 600 nm の透過光強度変化

クロロフィル分子数は 4.1×10^{16} 個

7分で放出された電子数は、 1.1×10^{16} 個

クロロフィル1分子が1分間で放出する見かけの電子数は 3.8×10^{-2} 個

単離葉緑体は、光合成能を保持していることが確認された。

金薄膜への葉緑体の固定

金を 50 nm 蒸着したカバーガラスを、immersion oil を使って直角プリズムの斜面に貼り付け、プラスチックセルを Oリングで圧着した。金表面を 5 mM の Mercaptoundecanoic acid (MUA) 溶液に暗所で 2 時間浸漬させ、表面に MUA の単分子膜を形成させた。葉緑体を固定化するための一連の吸着剤をその上に展開して、室温で 1 時間放置した後蒸留水で洗浄した。葉緑体チラコイド懸濁液を塗布して 4 で 1 時間放置した後超純水で洗浄した。

金薄膜に葉緑体を固定化する方法として、今回は静電的な吸着を用いることにした。吸着剤として、以下の A~E、5 つの方法を試みた。

- A. 吸着剤なしで、MUA に直接葉緑体を固定
- B. カルボキシメチルデキストラン (CMD)

- C. DEAE-ポリリシン (Fig.2)
- D. DEAE-デキストラン
- E. DEAE-セルロース

金薄膜上に固定化した葉緑体チラコイドの光合成機能の定量

溶液中と同じく DCPIP の Hill 反応より検証した。溶液中とは異なり、表面プラズモンを用いてクロロフィルを励起した (Fig.3)。溶液中と同様に、DCPIP の消失を 600nm における吸光度変化から定量した。金薄膜に固定化された葉緑体のクロロフィル分子数は、分光光度計を用いて 652 nm の吸光度から求めた。

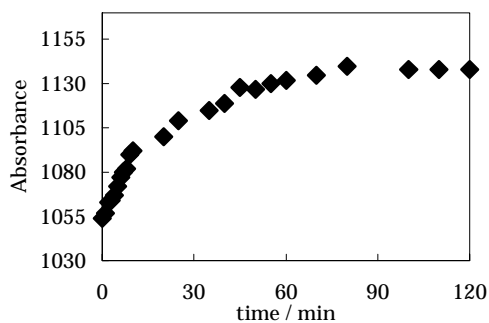


Fig.2 表面プラズモン共鳴を用いて固定化チラコイドを励起したときの 600 nm の透過光強度変化、吸着剤は DEAE-ポリリシン

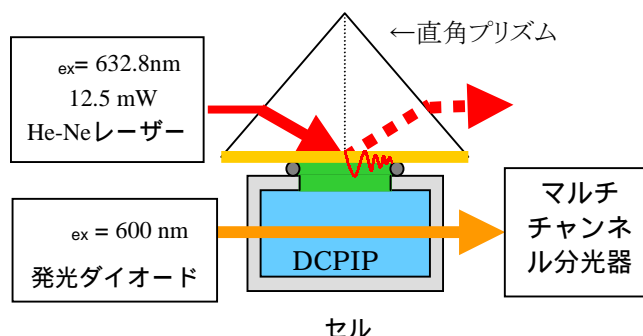


Fig.3 表面プラズモン励起反応装置

各方法における結果を Table 1 に示す。

Table.1 各吸着剤における結果

	固定されたクロロフィル分子数(個)	消費された DCPIP 分子数(個)	発生電子数 (個)	クロロフィル 1 分子あたりの放出電子数(個)	見かけの反応速度定数(s^{-1})
A	1.2×10^{17}	3.6×10^{15}	7.1×10^{15}	0.06	1.5
B	2.1×10^{17}	7.2×10^{15}	1.4×10^{16}	0.07	2.0
C	1.2×10^{16}	8.9×10^{15}	1.8×10^{16}	1.5	3.8
D	8.3×10^{16}	1.7×10^{16}	3.3×10^{16}	0.4	2.7
E	8.7×10^{16}	7.3×10^{15}	1.4×10^{16}	0.2	1.4

ポリリシンを吸着剤として使用した場合、金薄膜に固定化されたクロロフィル分子数が少ないにもかかわらず、クロロフィル 1 分子あたりの電子放出量が最も多い。表面プラズモンは表面にのみ電場が局在するので、もし葉緑体が溶液中に遊離してしまうと励起されなくなってしまう。CMD や DEAE デキストラン、DEAE セルロースでは吸着力が弱いため、時間が経つと葉緑体が遊離している可能性がある。これに対して、ポリリシンを吸着剤として用いた場合、葉緑体の薄膜がプラズモン励起に最適の厚さになり、長時間安定して金薄膜に葉緑体を固定できると思われる。さらに、DEAE ポリリシンを使った場合は高い再現性が得られた。以上の結果から、葉緑体を金薄膜に固定化する吸着剤はポリリシンが最適であることが判明した。

今後、ポリリシンを吸着剤として葉緑体を金薄膜に固定し、実際に酵素フェレドキシン NADP レラクダーゼをチラコイド膜に埋め込んで、酸化還元反応を起こさせる予定である。

【参考文献】1) 岡田雅人、宮崎香織 「タンパク質実験ノート[上] 抽出と分離精製」 羊土社